

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 7 月 15 日 (15.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/058965 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, 5/10, C12Q 1/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016188
- (22) 国際出願日: 2003 年 12 月 17 日 (17.12.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-367272
2002 年 12 月 18 日 (18.12.2002) JP
特願 2003-42253 2003 年 2 月 20 日 (20.02.2003) JP
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 玉巻 伸章 (TAMAMAKI, Nobuaki) [JP/JP]; 〒599-8124 大阪府堺市南野田 3 5 2-3 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062 東京都港区南青山 6 丁目 1 1 番 1 号 スリーエフ南青山ビルディング 7F Tokyo (JP).

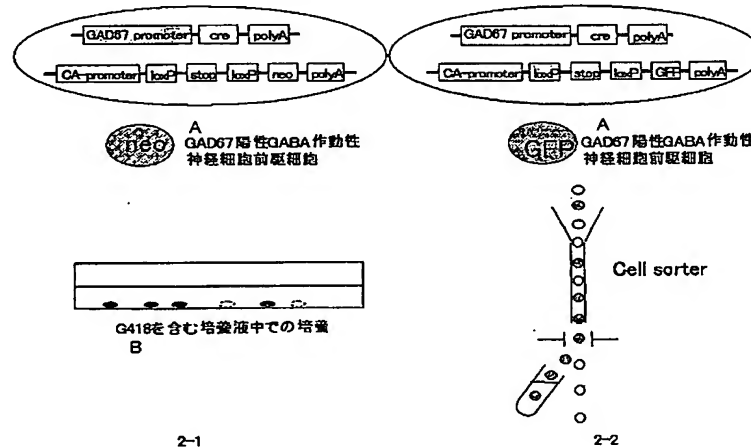
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SEPARATING PRECURSOR CELLS PRODUCING GABAERGIC NERVE CELLS ALONE

(54) 発明の名称: GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法



(57) Abstract: To treat epilepsy or schizophrenia by transplanting precursor cells of GABAergic nerve cells into a region with lack or decrease in GABAergic nerve cells in the brain of a patient suffering from the disease, it is intended to provide a method of separating precursor cells of GABAergic nerve cells in an adult or fetal nerve tissue or precursor cells of GABAergic nerve cells derived from embryo stem cells. This method comprises the step of preparing a cell mass containing precursor cells of GABAergic nerve cells, the step of transferring cells having DNA, to which a reporter gene emitting fluorescence detectable *in vivo* is attached, dispersed therein into the downstream of a promoter of a regulatory nerve transmitter GABA synthase GAD67 gene or a GAD65 gene, the step of isolating GABAergic nerve cells and precursor cells of GABAergic nerve cells based on the presence/absence of the fluorescence from the reporter gene, and the step of isolating the precursor cells of GABAergic nerve cells based on proliferative capability.

[続葉有]



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 癲癇症患者や分裂病患者の脳内でGABA作動性神経細胞が欠如ないしは減少した領域にGABA作動性神経細胞前駆細胞を移植することにより、同疾患の治療を行うことを目的として、成体又は胎児神経組織中のGABA作動性神経細胞前駆細胞、ないしは胚性幹細胞から誘導したGABA作動性神経細胞前駆細胞を分離する方法を提示する。この出願の発明は、GABA作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞集団を調製する工程、抑制性神経伝達物質GABAの合成酵素GAD67遺伝子またはGAD65遺伝子のプロモーター下流に、生体でも検出できる蛍光を発するレポーター遺伝子をつないだDNAを分散した細胞に導入する工程、レポーター蛋白の蛍光の有無によりGABA作動性神経細胞とGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、および増殖能を持つことによりGABA作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程を含む。

明細書

GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法

5

技術分野

この出願の発明は、抑制性神経細胞を欠落した乃至は減少した領域の抑制性神経細胞の数を正常値に戻すことに用いる、GABA 作動性神経細胞のみを生み出す GABA 作動性神経細胞前駆細胞を分離する方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、GABA 作動性神経細胞前駆細胞の分離を可能にすることにより、GABA 作動性神経細胞を欠落した乃至は減少した領域を正常に戻すことにより、癲癇症や分裂病の治療を行う治療行為を可能にする医療用材料等としての前駆細胞分離方法に関するものである。

15

背景技術

中枢神経系の神経細胞には興奮性の神経細胞と抑制性の神経細胞がある。両者の神経細胞が中枢神経の領域により異なる様々な比率で含まれていて、情報処理が行われている。大脳皮質では抑制性神経細胞は神経伝達物質として γ -aminobutyric acid (GABA) を使い、興奮性神経細胞は Glutamate を使う。大脳皮質の抑制性神経細胞は神経細胞の 20% 程度の比率で存在することにより、神経回路全体としては適度な活動度を維持することができ、スムーズな情報処理を営むことができる。しかしながら時として、全ての神経細胞が興奮し始め、結果として意識を失う癲癇発作が起きる。このような発作が起きる原因には、子供の間は脳の神経回路発達が未熟なために、発熱により神経細胞が興奮しやすくなって生じる熱性痙攣もあるが、多くは遺伝的背景があり、癲癇症患者の多くは、神経細胞の興奮に関わるチャンネル分子にポイント変異があり、興奮しやすくなっていると考えられている。また細胞移動の分子メカニズムに異常がある場合に

30

は、大脳皮質の灰白質部が二分してしまい、入出力関係がアンバランスになり、癲癇様発作を繰り返す場合もある。いずれの場合も、神経回路に生じたショート様の異常状態であり、過発火により多量のカルシウムが細胞体に流入することにより細胞死に至ることが考えられる。しかし全ての神経細胞に起こるわけではなく、

5 このようなショートの状態が起こるのを止める役目にある抑制性神経細胞が特に過大な入力を受け、他の興奮性神経細胞よりも先に死滅して行く。このような状態になると難治性の癲癇発作のフォーカスと呼ばれ、フォーカスにある抑制性神経細胞は激滅していて、繰り返し癲癇発作の発祥元となる。このような状態にある難治性の癲癇症では治療薬では追いつかず、フォーカス領域を切除して癲癇発

10 作の発生を抑える根治療法が行われる。しかし脳の一部を切除するため切除される脳が持っていた機能は失われる。このような癲癇発作フォーカスに GABA 作動性神経細胞前駆細胞を移植により供給して生着させることができたならば癲癇発作を抑えることが期待できる。この目的のために必要となる GABA 作動性神経細胞はどのようなものであってもいいのではなく、百を超える GABA 作動性神

15 経細胞のサブタイプの内の、大脳皮質の興奮性の神経細胞の活動を抑えることのできる GABA 神経細胞でなければならない。例えば癲癇症の患者のフォーカスにはどのようなサブタイプの GABA 作動性神経細胞を移植すれば良いかと言えば、興奮性神経細胞が興奮するつどに、周りの興奮性神経細胞からの戻されてくる興奮性入力に対抗し抑制できる、細胞体部分に抑制を加えるバスケット細胞や

20 軸索起始部に抑制を加えるシャンデリア細胞が必要となる。

現在までのところ人間の脳新皮質 GABA 作動性神経細胞の起源は十分に理解されていなかった。この出願の発明者はこれまでに、げっ歯類の大脳皮質 GABA 作動性神経細胞の起源は脳基底核原基に起源を持つことを発見し、

25 1997 年に 11 月 1 日に報告している(Tamamaki et al., J. Neurosci 17: 8313-8323 1997)。またこれとは別に、米国の Anderson S.も、1997 年に 10 月 27 日に同様の報告している(Anderson et al., Science 278: 474-476 1997)。さらにその起源は、脳基底核原基の中でも内側基底核原基に限られることが報告されており(Lavdas et al. J. Neurosci 19:7881-7888 1999)、脳基底核原基

30 の中でも内側に限られることは、胎児組織の移植によっても確認されている

(Wichterle et al., Development 128:3759-3771 2001)。しかし大脳基底核原基以外に起源が無いのかの点は確認されていなかった。そのような中、人間では GABA 作動性神経細胞の起源が大脳皮質にもあり、65%は大脳皮質で、35%は大脳基底核原基で作られるとする報告がある (Letinic et al., Nature 417: 645-649 2002)。この報告にある 65%の大脳皮質由来の GABA 作動性神経細胞前駆細胞は、脳室帯ないし脳室下帯にある神経幹細胞の分裂により供給され、Mash1 陽性で特徴付けられると考えた。しかし、このような観察結果は、この出願の発明者のげっ歯類での GABA 作動性神経細胞の起源を調べた最新の研究での個々の観察結果と一部一致するものであるが、起源に関する解釈は発明者の解釈と大きく異なるものである。この出願の発明者のげっ歯類での研究によれば、GABA 作動性神経細胞の起源は大脳基底核原基にあり、大脳皮質に移動した GABA 作動性神経細胞の一部は前駆細胞に脱分化するか、大脳皮質に移動した GABA 含有細胞の一部は前駆細胞であり、大脳皮質で新たに GABA 作動性神経細胞を供給していると考えられる。人間の場合も、観察結果の同一性から考えて、大脳皮質の GABA 作動性神経細胞は、大脳基底核原基の細胞に由来すると考えられる。

しかし GABA 作動性神経細胞前駆細胞は大脳新皮質内のみで見られるものではない。ES 細胞や神経幹細胞を培養する際に適当な培養条件を設けると、同細胞は神経前駆細胞に分化を始め、分化した神経前駆細胞の多くのものが GABA 作動性神経細胞も産生するようになる。これらの GABA 作動性神経細胞前駆細胞を、癲癇症患者の発作フォーカスに移植により供給して生着させることができたならば癲癇発作を抑えることも期待できるが、これまでのところ培養条件下で得られた GABA 作動性神経細胞は GABA を含まない神経細胞、グリア細胞との混合物としてしか得ることができていない。

なお、この出願の発明に関連する刊行物としては、既に挙げたものを含め、以下がある。

- 1 . Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JLR. (1997) Interneuron migration from the basal forebrain to the neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278: 474-476.
2. Dupuy ST, Houser CR. (1996) Prominent expression of two forms of glutamate decarboxylase in the embryonic and early postnatal rat hippocampal formation. *J Neurosci.* 16: 6919-6932.
- 3 . Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL. (1996) Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16: 1091-1100.
- 4 . Jin X, Mathers PH, Szabo G, Katarova Z, Agmon A. (2001) Vertical bias in dendritic trees of non-pyramidal neocortical neurons expressing GAD67-GFP in vitro. *Cereb Cortex.* 11: 666-678.
- 5 . Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG. (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19: 7881-7888.
- 6 . Letinic K, Zoncu R, Rakic P. (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417: 645-649.
- 7 . Nakamura K, Nakamura K, Kometani K, Yanagawa Y, Iwasato T, Obata K, Minato K, Kaneko T, Tamamaki N. (2003) Immigration of the proliferative progenitors for GABAergic neurons from the ganglionic eminence to the neocortex. *Society for Neurosci. Abst.* 33th.
- 8 . Porteus MH, Bulfone A, Liu JK, Puelles L, Lo LC, Rubenstein JL. (1994) *DLX-2*, *MASH-1*, and *MAP-2* expression and bromodeoxyuridine incorporation define molecularly distinct cell populations in the embryonic mouse forebrain. *J Neurosci* 14: 6370-6383.
- 9 . Reynolds BA, Weiss S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-10.

10. Tamamaki N, Fnmjori K, Takauji R. (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. J Neurosci 17:8313-8323.

11. Tamamaki N, Sugimoto Y, Tanaka K, Takauji R. (1999) Cell
5 migration from the ganglionic eminence to the neocortex investigated by labeling nuclei with UV irradiation via a fiber optic cable. Neurosci Res. 35: 241-251.

12. Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T. (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with
10 calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the gad67-gfp knock-in mouse. J Comp Neurol 467: 60-79.

13. Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S. (1993) bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. Neuron 11:
15 951-966.

14. Westmoreland JJ, Hancock CR, Condie BG (2001) Neuronal development of embryonic stem cells: a model of GABAergic neuron differentiation. Biochem Biophys Res Commun 284: 674-680.

20

発明の開示

この出願は、前記の課題を解決する発明として、GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

- 25 (a) GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞集団を調製する工程；
- (b) 抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素 GAD67 遺伝子または GAD65 遺伝子のプロモーター下流に、生体でも検出可能なシグナルを発するレポーター蛋白の cDNA をつないだ DNA を、細胞集団の各細胞に導入する工程；
- (c) レポーターの発するシグナルの有無により GABA 作動性神経細胞と GABA
30 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；

(d) 増殖能を持つことにより GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法を提供する。

またこの出願の発明は、GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分

5 離方法であって、以下の工程：

(a) GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞集団を調製する工程；

(b) 抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素 GAD67 遺伝子または GAD65 遺伝子のプロモーター下流に、薬剤耐性の性質を付与する蛋白の cDNA をつないだ DNA を、細胞集団の各細胞に導入する工程；

10 (c) 薬剤耐性の有無により GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；

(d) 増殖能を持つことにより GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法を提供する。

15 さらにこの出願の発明は、GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

(a) GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞集団を調製する工程；

(b) 抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素 GAD67 遺伝子または GAD65 遺伝子のプロモーター下流に、遺伝子組み換え酵素の cDNA を結合した DNA と、
20 遺伝子組み換え後に生体でも検出可能なシグナルを発するレポーターを発現するカセット DNA を、細胞集団の各細胞に導入する工程；

(c) レポーター蛋白の蛍光の有無により GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；

(d) 増殖能を持つことにより GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、
25 を含むことを特徴とする方法を提供する。

さらにまた、この出願の発明は、GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

(a) GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞集団を調製する工程；

30 (b) 抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素 GAD67 遺伝子または GAD65 遺伝

子のプロモーター下流に、遺伝子組み換え酵素の cDNA を結合した DNA と、
遺伝子組み換え後に薬剤耐性の性質を付与する蛋白を発現するカセット
DNA を、細胞集団の各細胞に導入する工程；

- 5 (c) 薬剤耐性の有無により GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆
細胞を単離する工程；
(d) 増殖能を持つことにより GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、
を含むことを特徴とする方法を提供する。

10 前記の各発明においては、工程は(a)～(d)の順序で行うことが好ましいが、こ
れに限定されるものではなく、各工程は適宜に変更することができる。例えば、
(a)－(d)－(b)－(c)といった順番でもよく、あるいは(a)－(b)－(d)－(c)であつても
よい。また、例えば発現カセット DNA を導入遺伝子とするトランスジェニック
動物の作出によって工程(b)を行うこともでき、その場合には、(b)－(a)－(c)－
(d)や(b)－(a)－(d)－(c)といった順番で各発明を実施することもできる。

15

また前記の各発明においては、工程(a)において、胚性幹細胞または神経幹細胞から誘導した GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞集団を調製するか、
またはドナーの GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を分散して細胞集団
を調製することを好ましい態様としている。

20

さらに前記の各発明においては、DNA 導入法が、ウイルスを介した形質転換、
電気穿孔、リポソームを介した形質転換のいずれかを含むことを好ましい態様と
している。

- 25 また前記の各発明においては、ドナーが哺乳動物であること、そして哺乳動物
がヒトであることを別の好ましい態様としている。

またさらに、前記の各発明においては、さらに、ステップ(d)で分離した細胞
をレシピエントに移植することを含むことを好ましい態様としてもいる。

30

この出願の発明はさらに、前記発明のいずれかの方法により得られた、GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞を提供する。

さらにまた、前記発明のいずれかの方法において、GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞を得るために試用する試薬および細胞のキットを提供する。

なお以下の説明では、「GAD67 遺伝子のプロモーター」を「GAD67 promoter」と、「GAD65 遺伝子のプロモーター」を「GAD65 promoter」と記載することがある。

10

図面の簡単な説明

図 1 は、この発明の方法を実施するのに必要となる DNA コンストラクトを 1 から 5 に示す。1 - 2 は、直接 GAD67 promoter に GFP 遺伝子や neo mycin 耐性遺伝子をつないだもので、GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞で GFP や neo mycin 耐性遺伝子が発現し、GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞を分離するために利用する。3 - 5 は GAD67 promoter 活性によって発現する Cre recombinase を利用して、GFP や neo mycin 耐性遺伝子を GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞に発現させて、GABA 作動性神経細胞前駆細胞を分離するために利用する。詳しくは、3 は、GAD67 promoter に Cre recombinase DNA をつないだコンストラクトであり、4 は GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞を、Cre recombinase を介した GFP の発現を利用して分離する方法に使う DNA コンストラクトである。5 は GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞を、Cre recombinase を介した neo mycin 耐性遺伝子の発現を使って分離する方法に使う DNA コンストラクトである。

図 2 は、発明の実施の形態の説明図である。(2 - 1) は、薬剤耐性遺伝子 (neo mycin 耐性遺伝子) を利用した GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞の分離法を示す。図にある二種類の DNA コンストラクト (図 1

30

の 3 番と 5 番) を細胞に導入した場合、GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞では GAD67 promoter 活性のため Cre recombinase が発現し、stop signal DNA は切り取られ、neo mycin 耐性を獲得するので、neo mycin 分解酵素の発現により Geneticin などを選別することができる。遺伝子の導入には、レトロウイルスや一時的な発現せる真核細胞での複製オリジンを持つアデノウイルスなどによって導入が可能である。(2-2) は、生体細胞を可視化できるレポーターDNA(GFP)を利用した GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞の分離法を示す。図にある二種類の DNA コンストラクト(図 1 の 3 番と 4 番) を細胞に導入した場合、GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞では GAD67 promoter 活性のため Cre recombinase が発現し、stop codon 配列は切り取られ、CA プロモーターにより GFP の発現が始まる。結果 GFP 蛍光の有無によりセルソーターを使って GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞を選別することができる。上記遺伝子の導入には、レトロウイルスや一時的な発現をさせる真核細胞での複製オリジンを持つアデノウイルスなどによって導入が可能である。

図 3 は、GAD67 promoter の下流に GFP cDNA を結合した DNA をノックインしたマウスから、GFP 陽性 GABA 作動性神経細胞と GFP 陽性 GABA 作動性神経細胞前駆細胞をセルソーターを使って分離した際のデータを示す。左上は、細胞数と GFP 蛍光強度の関係をグラフにしたもので、コントロールに比べて蛍光を有意に発している範囲の細胞を採集した。採集した細胞は、細胞増殖因子を加えただけの基本培養液を予め大脳皮質と大脳基底核原基を一日培養して調整した培養液中で培養した。さらに BrdU を添加して細胞増殖の際の DNA 合成を検出した。右上の図にあるように GABA 作動性神経細胞前駆細胞は BrdU を取り込んだが、DNA 合成阻害剤を加えると DNA への取り込みは見られなかった。下の図は GFP 陽性の GABA 作動性神経細胞前駆細胞が BrdU を二つの核中の DNA に取り込んで、分裂しているところの像である。

この出願の前記発明において、神経幹細胞は、中枢神経系を構成する全ての種の細胞を供給することのできる細胞であるのに対し、「前駆細胞」とは、神経幹細胞から生み出され、増殖することができるが、限られた細胞種に分化しうる細胞のことをいう。例えば、希突起膠細胞の前駆細胞として、O-2A progenitor cell が知られているし、GABA 作動性神経細胞の前駆細胞としては、嗅球顆粒細胞を供給する前脳胞脳室下帯の前駆細胞が知られている。しかしこれまでに、大脳新皮質の実質内に大脳新皮質の GABA 作動性神経細胞を生み出す前駆細胞が存在することは知られていなかった。この出願の発明者による以下の観察結果は、

5 細胞のことをいう。例えば、希突起膠細胞の前駆細胞として、O-2A progenitor cell が知られているし、GABA 作動性神経細胞の前駆細胞としては、嗅球顆粒細胞を供給する前脳胞脳室下帯の前駆細胞が知られている。しかしこれまでに、大脳新皮質の実質内に大脳新皮質の GABA 作動性神経細胞を生み出す前駆細胞が存在することは知られていなかった。この出願の発明者による以下の観察結果は、

10 GABA 作動性神経細胞の前駆細胞が大脳皮質脳実質内に存在する直接および間接証拠である。

1. 胎児期 E16 のマウスに BrdU を取り込ませ、直ちに還流固定して BrdU、MAP2 の二重標識をすると、中間帯の MAP2 陽性移動細胞が BrdU 免疫活性と

15 重なるものが見つかる。これは、中間帯の MAP2 陽性移動神経細胞（GABA 含有神経細胞）が、細胞分裂に備えて DNA を複製していたことを意味する。

2. 誕生直ぐの GAD67-GFP knock-in マウスに同様の BrdU パルスラベルを行っても、GFP 陽性 GABA 作動性神経細胞の中にも BrdU 免疫活性を持つもの

20 があり、二重標識されて確認される。二重標識された GFP 陽性神経細胞は、細胞分裂に備えて DNA を複製していたことを意味する。

3. 発明者が行った実験によると、胎児大脳側脳室に GAP43-EGFP を発現させるアデノウイルスを注入し、脳室帯に感染させ、生後 20 日目に GFP 陽性神経細胞を見ると、E17 以前にウイルスを注入したときには GABA 作動性神経細胞

25 と思われる非錐体細胞が多く観察されるが、E17 以降にウイルスを注入しても非錐体細胞は観察されなくなる。それに対し、幾つかの他の研究室からの報告によると、BrdU 注入による実験では、GABA 作動性神経細胞は E14 以降、出産後まで続けて分裂増殖しているとされている。この二つの実験の意味するところ

30 は、E17 以降大脳皮質に GABA 神経細胞を供給する前駆細胞は、アデノウイルス

スが側脳室から感染できる脳室帯には存在しなくなるが、脳実質内の何処かで分裂し続けていることを意味する。

4. マウス E15 胎児の側脳室にアデノウイルスを胎児側脳室に注入したときに見られる GABA 作動性神経細胞と思われる非錐体細胞は、様々な形態を持つサブタイプに分かれる。それぞれのタイプは、異なる幹細胞から生み出されたと考えられている。SV40 origin を持たず、細胞増殖の際に増えることの無いアデノウイルスを感染させたときには、ほとんど同一のサブタイプの非錐体細胞を同一サンプルで観察することは少なく、近傍に同一のサブタイプの非錐体細胞を観察することは無い。それに対し、SV40 origin を入れた、細胞増殖の際に細胞とともに増えるアデノウイルスを感染させたときには、頻りに複数の同一サブタイプの非錐体細胞が近接して分布するのを観察した。この観察結果の意味するところは、ひとつの GABA 作動性神経細胞の前駆細胞は、同一サブタイプの非錐体細胞を脳実質内で生み出していることを示唆している。

15

この出願の発明者は、側脳室帯にある神経幹細胞は GAD67 陰性であるのに対し、側脳室帯の GABA 作動性神経細胞前駆細胞は、GABA 作動性神経細胞のように神経回路を形成して GABA を分泌しているわけでもないにも拘らず、GABA 合成酵素 GAD67 陽性であることを発見した。この発見は、側脳室帯 GABA 作動性神経細胞の分化の細胞系譜において、多種類の細胞を生み出す神経幹細胞と GABA 作動性神経細胞のみを生み出す GABA 作動性神経細胞前駆細胞を区別する明らかな形質の違いであった。

この様な GAD67 promoter 活性を使って GFP を発現させる試みは、GABA 作動性神経細胞に GAD67 promoter に GFP cDNA をつないだ DNA をジェンガンで導入した例が報告されている(Jin et al., Cereb Cortex 2001 11: 666-678)。また、GAD67 promoter の下流に GFP cDNA をつないで染色体上に組み込んだ GAD67-GFP knock-in mouse では、GFP がほぼ 100%の精度で GAD67 陽性細胞に発現していた(Tamamaki et al., 2003)。このマウスを使って GABA 作動性神経細胞前駆細胞を観察したところ、緑色蛍光を発していると

30

ころが観察された(Nakamura et al., 2003)。のこの違いを利用して、神経幹細胞や他の種の細胞から、GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞を分離し、さらに GABA 作動性神経細胞前駆細胞のみを分離する。加えて、GAD67 と GAD65 遺伝子は、胎児期より大脳皮質のほとんどの細胞で共存する
5 ことが知られていたので(Dupuy and Houser, 1996)、GAD67 promoter の代わりに GAD65 promoter を用いても、ほとんど同様の結果が得られる。

生体内の GABA 作動性神経細胞前駆細胞が GAD67 promoter 活性を持つことが申請者らの研究で示されており(Nakamura et al., 2003)、胚性幹細胞や神経
10 幹細胞から誘導された細胞中にも GAD67 promoter 活性を持つものがあることが報告されている(Westmoreland et al., 2001)。

GAD67 または GAD65 のプロモーター下流に生体でも検出できる蛍光を発するレポーター遺伝子や薬剤耐性遺伝子を繋ぎ、GABA 作動性神経細胞前駆細胞
15 と GABA 作動性神経細胞を含む細胞集団に導入することで、レポーター蛋白の蛍光や薬剤耐性で GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞を確認することができる。蛍光を放つ GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞はセルソーターで分離ができるし、薬剤耐性の GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞は薬剤を培養液に加えることにより分離
20 できる。このとき培養液中で永く培養増殖させれば、分裂能の GABA 作動性神経細胞前駆細胞のみを得ることができる。

例えば、緑色の蛍光を発するくらげ蛋白、Green Fluorescent Protein (GFP) cDNA を GAD67 promoter につないだ DNA (図 1 の 1) を、DNA 細胞内導入
25 試薬やウイルス、電気穿孔法などで導入すると GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞が緑色蛍光を発する。GAD65 promoter を使用した場合も同様の効果が得られる。この GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を切り出し、0.05% Trypsine-EDTA で処理することで個々の細胞を分散させ、細胞撹濁液をセルソーターにかけることで GABA 作動性神経細胞前駆細胞と
30 GABA 作動性神経細胞を分離することができる。分離した細胞を、大脳皮質と

大脳基底核原基を含む脳のスライスを培養した conditioned medium を用いて分離した GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞を培養増殖させると、GABA 作動性神経細胞前駆細胞は増殖し、GABA 作動性神経細胞は暫時その数を減らしていく。

5

GFP の代わりに、neo mycine 耐性遺伝子を GAD67 promoter または GAD65 promoter につなぎ(図 1 の 2)、GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞群に導入する。同細胞群を分散培養する際の培養液に Geneticin (G418)を入れて培養をすることで、GAD67 promoter 活性を持つ GABA 作動性神経細胞前駆細胞以外は死滅するので、GABA 作動性神経細胞前駆細胞のみを選び出すことができる。

10

しかし、GAD67 promoter や GAD65 promoter 活性は GABA 作動性神経細胞前駆細胞の細胞周期に伴い変化するのに加え、概して GABA 作動性神経細胞のそれより常に低い。そのまま GAD67 promoter または GAD65 promoter を GFP や neo の DNA につないでも、現在我々が細胞系譜に従って分類している primary GABAergic neuron progenitor, secondary GABAergic neuron progenitor によって GAD67 promoter や GAD65 promoter 活性の強さが異なることがあり、GABA 神経細胞前駆細胞の種類によって採取効率に影響が出る

20 ことが考えられる。この影響を除くため、図 1 の 3 - 5 にあるような DNA コンストラクトを準備する。図 1 の 3 では、DNA 組み換え蛋白として Cre recombinase を用いているが、これは使用できる DNA 組み換え蛋白を Cre recombinase に限ることを意味しているのではない。図 1 の 4 - 5 に、DNA 組み換え酵素が認識する DNA 配列 (例えば loxP) が順方向に二つ並ぶ間に、生体

25 細胞を可視化できるレポーター DNA (例えば GFP) や、薬剤耐性遺伝子 DNA (例えば neo mycin 耐性遺伝子) を配置し、強制発現プロモーター (例えば CA promoter、日本特許番号 2824433、2824434) を含む DNA に結合させておく。この二つの DNA コンストラクト (3 と 4、乃至は 3 と 5) を、GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞群に導入する。GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞では GAD67 および GAD65 promoter 活性があるの

30

で、DNA 組み換え酵素が発現し、二つの DNA 組み換え酵素が認識する DNA 配列の間で組み換えが起こり、その間にあった stop codon は除去される。その結果、生体細胞を可視化できるレポーター（例えば GFP）を発現させた場合は、セルソーターを用いて GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞を分離することができ、薬剤耐性蛋白を発現させた場合は、培養液中に薬剤(例えば Genetisin)を入れることで GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞だけが選別される（図 2）。さらに大脳皮質と大脳基底核原基を含む脳のスライスを培養した conditioned medium を用いて培養を続けると、GABA 作動性神経細胞前駆細胞は増殖し、GABA 作動性神経細胞は暫時その数を減らしていく。

これまで、胚性幹細胞や神経幹細胞の培養条件を調節することで、GABA 作動性神経細胞を始め様々な細胞が誘導されてきた。しかし何れの条件でも、単一種の細胞のみを産生する系はなく、治療に用いる前に再度の分離が必要となり、細胞活性を損なうこととなっていた。この出願の発明によって、GABA 作動性神経細胞前駆細胞が純度高く得られる。GABA 作動性神経細胞前駆細胞は GAD67 および GAD65 陽性であり、GAD67 陽性および GAD65 陽性の細胞を産生するので、脳内では GAD67 および GAD65 陽性細胞は GABA 作動性神経細胞だけであることを考えると、GABA 作動性神経細胞前駆細胞を培養することにより、GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞のみを生み出す系が提供される。

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例

GAD67 promoter の直ぐ下流に GFP cDNA をつないだコンストラクトを gene targeting 方を用いてゲノム DNA 中に相同組み換えを利用して挿入したマ

ウス、GAD67-GFP knock-in mouse を用いて、その大脳皮質内の GABA 作動性神経細胞前駆細胞を分離した。このマウスのゲノム上には図 1 の 1 にある DNA を導入したのと同じ状態が全ての細胞に形成されている。それ故、GAD67 promoter 活性のある細胞は全て GFP を発現しており、また逆に、GFP を発現している細胞は全て GAD67 陽性であり、脳内では GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞と見なしうることは、先に調べて報告済みである (Tamamaki et al., submitted)。

大脳皮質では GABA 作動性神経細胞前駆細胞が GABA 作動性神経細胞を産生し続けている出産直後ないしは、胎生 18 日目の GAD67-GFP knock-in mouse の大脳皮質を取り出し、0.5%トリプシン蛋白分解酵素で処理をすることで細胞外基質と細胞接着分子を部分分解することにより、細胞を分散させた。分散させた細胞を PBS で浸し、FACS (fluorescence activated cell sorter)に通し、GFP 陽性細胞を培養液に受け取った (図 2-2)。この際、採取された細胞の GFP 蛍光強度は図 3 の左上に示されている。採取した GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞を培養するのに用いた培養液は、ニューロスフェア法 (Reynolds and Weiss, 1992; Vescovi et al., 1993; Gritti et al., 1996) にある細胞増殖因子を加えただけの基本培養液で大脳皮質と大脳基底核原基を一日培養した後、フィルターで細胞を除いて得た調整培地 (conditioned medium) であった。

細胞採取後、培養液中で GABA 作動性神経細胞前駆細胞の一部は、細胞分裂をはじめた。図 3 の下の図は、分裂した細胞であるが、細胞分裂した細胞を確認するために培養液中に混ぜておいた BrdU を核内 DNA に取り込んでいた。この時 DNA 合成阻害剤を培養液に加えておくと、図 3 の右上の図にあるように BrdU は DNA に取り込まれなかったことから、細胞増殖による BrdU の取り込みであったことが確かめられた。また分裂した後の二つの娘細胞は、両方とも GFP 陽性であり、二つの一次 GABA 作動性神経細胞前駆細胞、ないしは一つの一次 GABA 作動性神経細胞前駆細胞と一つの二次 GABA 作動性神経細胞前駆細胞、ないしは二つの二次 GABA 作動性神経細胞前駆細胞、ないしは二つの GABA 作動性神経細胞を生み出したと考えられる。何れの場合であっても、それ以降培養条件が整えられていれば、GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神

経細胞関連細胞のみが生み出し続けられることが期待された。

産業上の利用可能性

5

これまで、胚性幹細胞や神経幹細胞の培養条件を調節することで、GABA 作動性神経細胞を始め様々な細胞が誘導されてきた。しかし何れの条件でも、単一種の細胞のみを産生する系はなく、治療に用いる前に再度の分離が必要となり、細胞活性を損なうこととなっていた。この出願の発明によって、GABA 作動性神経細胞前駆細胞が純度高く得られる。GABA 作動性神経細胞前駆細胞は GAD67 および GAD65 陽性であり、GAD67 および GAD65 陽性の細胞を産生するので、脳内では GAD67 および GAD65 陽性細胞は GABA 作動性神経細胞だけであることを考えると、GABA 作動性神経細胞前駆細胞を培養することにより、GABA 作動性神経細胞前駆細胞と GABA 作動性神経細胞のみを生み出す系が提供される。

10
15

請求の範囲

1. GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

- 5 (a) GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞集団を調製する工程；
(b) 抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素 GAD67 遺伝子または GAD65 遺伝子のプロモーター下流に、生体でも検出可能なシグナルを発するレポーター蛋白の cDNA をつないだ DNA を、細胞集団の各細胞に導入する工程；
(c) レポーターの発するシグナルの有無により GABA 作動性神経細胞と GABA
10 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；
(d) 増殖能を持つことにより GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法。

15 2. GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

- (a) GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞集団を調製する工程；
(b) 抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素 GAD67 遺伝子または GAD65 遺伝子のプロモーター下流に、薬剤耐性の性質を付与する蛋白の cDNA をつないだ DNA を、細胞集団の各細胞に導入する工程；
20 (c) 薬剤耐性の有無により GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；
(d) 増殖能を持つことにより GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法。

25 3. GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

- (a) GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞集団を調製する工程；
(b) 抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素 GAD67 遺伝子または GAD65 遺伝子のプロモーター下流に、遺伝子組み換え酵素の cDNA を結合した DNA と、
30 遺伝子組み換え後に生体でも検出可能なシグナルを発するレポーター蛋白を

発現するカセット DNA を、細胞集団の各細胞に導入する工程；

(c) レポーターの発するシグナルの有無により GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；

(d) 増殖能を持つことにより GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、

5 を含むことを特徴とする方法。

4. GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法であって、以下の工程：

(a) GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞集団を調製する工程；

10 (b) 抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素 GAD67 遺伝子または GAD65 遺伝子のプロモーター下流に、遺伝子組み換え酵素の cDNA を結合した DNA と、遺伝子組み換え後に薬剤耐性の性質を付与する蛋白を発現するカセット DNA を、細胞集団の各細胞に導入する工程；

15 (c) 薬剤耐性の有無により GABA 作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程；

(d) 増殖能を持つことにより GABA 作動性神経細胞前駆細胞を単離する工程、を含むことを特徴とする方法。

20 5. 工程(a)において、胚性幹細胞または神経幹細胞から誘導した GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む細胞集団を調製する請求項 1 から 4 のいずれかの方法。

6. 工程(a)において、ドナーの GABA 作動性神経細胞前駆細胞を含む組織を分散して細胞集団を調製する請求項 1 から 4 のいずれかの方法。

25 7. 工程(b)における DNA 導入法が、ウイルスを介した形質転換を含む、請求項 1 から 4 のいずれかの方法。

8. 工程(b)における DNA 導入法が、電気穿孔を含む、請求項 1 から 4 のいずれかの方法。

9. 工程(b)における DNA 導入法が、リボソームを介した形質転換を含む、請求項 1 から 4 のいずれいかの方法。

10. 胚性幹細胞または神経幹細胞が哺乳動物由来である、請求項 5 の方法。

5

11. 哺乳動物がヒトである、請求項 10 の方法。

12. ドナーが哺乳動物である、請求項 6 の方法。

10 13. 哺乳動物がヒトである、請求項 12 の方法。

14. さらに、ステップ(d)で分離した細胞をレシピエントに移植することを含む、請求項 1 から 4 のいずれかの方法。

15 15. 請求項 1 から 14 のいずれかの方法により得られた、GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞。

16. 請求項 1 から 14 のいずれかの方法において、GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞を得るために試用する試薬および細胞のキット。

20

1/3

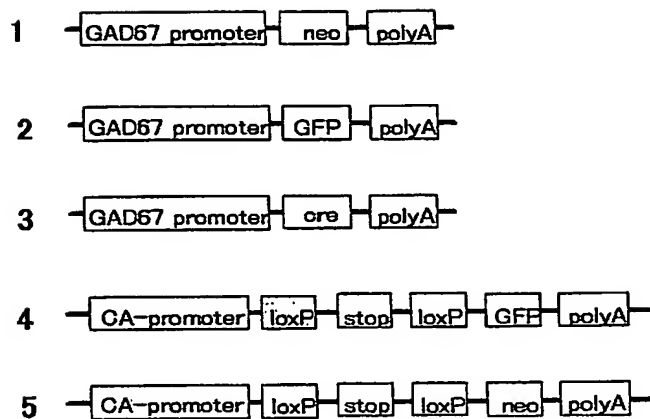
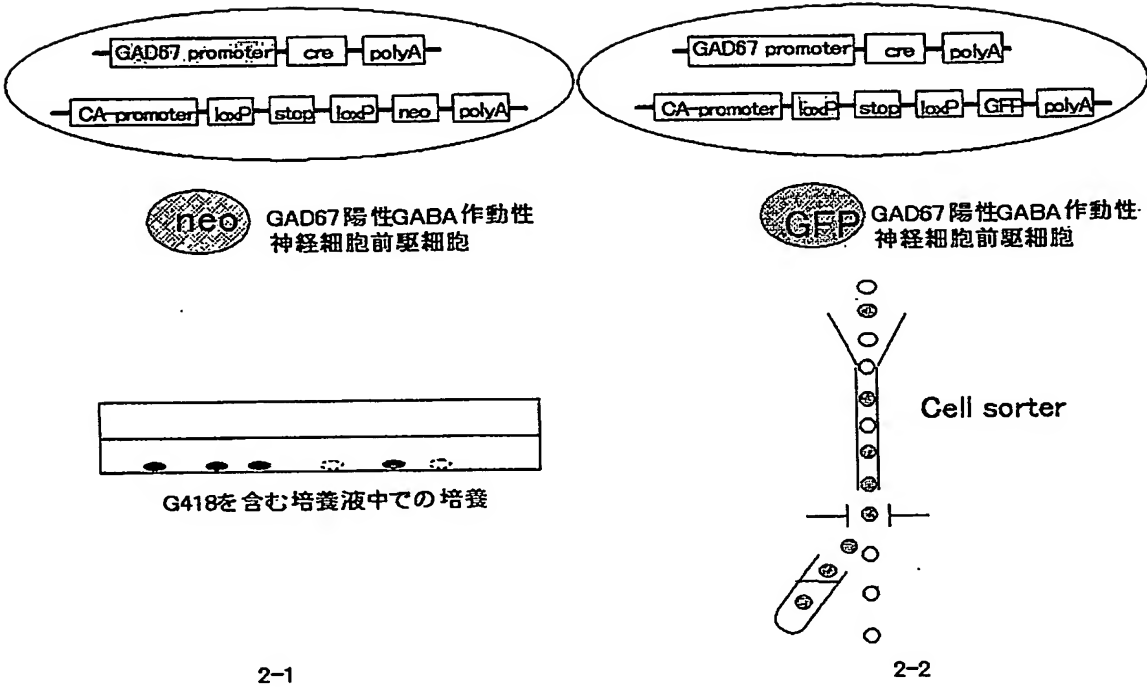
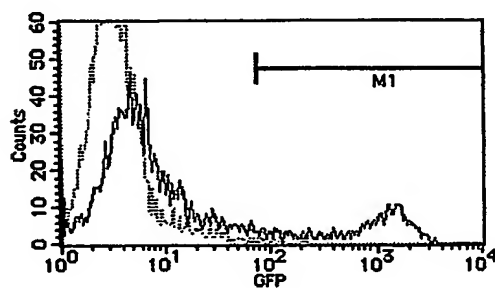
 1

図 2



3/3

3

Dotblotting and immunocytochemistry for BrdU in sorted

Sorted

293

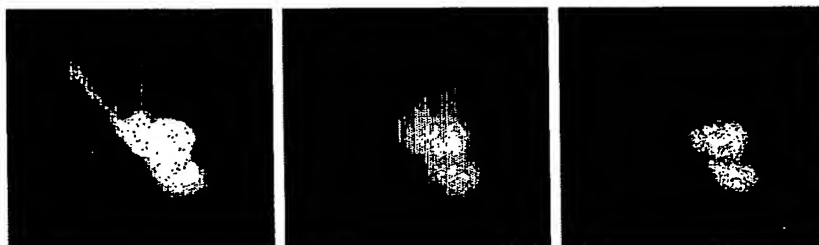
Medium +Ara-C

(5ng)

GFP

merged

BrdU



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/16188

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Westmoreland JJ. et al., Neuronal development of embryonic stem cells: a model of GABAergic neuron differentiation, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, Vol.284, pages 674 to 680	1-16
X	X.Jin et al., Vertical bias in dendritic trees of non-pyramidal neocortical neurons expressing GAD67-GFP in vitro, Cerebral Cortex, 2001, Vol.11, p. 666-78	1-16
A	G. Szabo et al., Differential regulation of adult and embryonic glutamate decarboxylases in rat dentate granule cells after kainate-induced limbic seizures, Neuroscience, 2000, Vol.100, p. 287-95	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
08 March, 2004 (08.03.04)

Date of mailing of the international search report
23 March, 2004 (23.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16188

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Patricia Varju, Sequential induction of embryonic and adult forms of glutamic acid decarboxylase durings in vitro-induced neurogenesis in cloned neuroectodermal cell-line, NE-7C2, Journal of Neurochem, February, 2002, Vol.80, p.605-15	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N5/10, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Westmoreland JJ. et al, Neuronal development of embryonic stem cells: a model of GABAergic neuron differentiation, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, Vol. 284, p. 674-680	1-16
X	X. Jin et al, Vertical bias in dendritic trees of non-pyramidal neocortical neurons expressing GAD67-GFP in vitro, Cerebral Cortex, 2001, Vol. 11, p. 666-78	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 03. 2004

国際調査報告の発送日

23. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中耕一郎

4N

3227

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	G. Szabo et al, Differential regulation of adult and embryonic glutamate decarboxylases in rat dentate granule cells after kainate-induced limbic seizures, Neuroscience, 2000, Vol.100, p.287-95	1-16
A	Patricia Varju, Sequential induction of embryonic and adult forms of glutamic acid decarboxylase during in vitro-induced neurogenesis in cloned neuroectodermal cell-line, NE-7C2, Journal of Neurochem, Feb.2002, Vol.80, p.605-15	1-16